

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-238100

(43) 公開日 平成7年(1995)9月12日

(51) IntCl ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 K 16/40		8318-4H		
C 1 2 N 5/10				
C 1 2 P 21/08		9161-4B		
		7729-4B	C 1 2 N 5/ 00	B
		9281-4B	15/ 00	C
審査請求 未請求 請求項の数5 FD (全 6 頁) 最終頁に続く				

(21) 出願番号 特願平6-52677

(22) 出願日 平成6年(1994)2月25日

特許法第30条第1項適用申請有り 平成5年8月25日、
社団法人日本生化学会発行の「生化学 第65巻 第8
号」に発表

(71) 出願人 000002130

住友電気工業株式会社

大阪府大阪市中央区北浜四丁目5番33号

(72) 発明者 松下 操

福島県福島市光が丘一番地 福島県立医科
大学生化学第二講座内

(72) 発明者 藤田 禎三

福島県福島市光が丘一番地 福島県立医科
大学生化学第二講座内

(74) 代理人 弁理士 西川 繁明

(54) 【発明の名称】 ヒトのMASPに対するモノクローナル抗体

(57) 【要約】 (修正有)

【目的】 ヒトのMASP (MBP会合セリンプロテアーゼ) に対するモノクローナル抗体またはその活性フラグメント、該モノクローナル抗体の製造方法、及び該モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの提供。

【構成】 齧歯類動物をヒトのMASPで免疫感作し、免疫した齧歯類動物から脾臓を摘出して常法に従ってマウスのもエローマ細胞と融合し、選択的培養法により抗体産生細胞とミエローマ細胞が融合したハイブリドーマを選別し、限界希釈法により、単一クローンにし、この単一クローンのハイブリドーマの培養上清液からモノクローナル抗体を回収して得られるヒトのMASPに対するモノクローナル抗体、その製造方法、及び上記のハイブリドーマ。

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ヒトのMASP (MBP会合セリンプロテアーゼ) に対するモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。

【請求項2】 ヒトのMASPが活性型であるものに対する請求項1記載のモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。

【請求項3】 (1) 齧歯類動物をヒトのMASPで免疫感作し、(2) 免疫した齧歯類動物から脾臓を摘出して、脾細胞の懸濁液を形成し、(3) 該脾細胞懸濁液をマウスのミエローマ細胞と融合促進剤の存在下で混合して、両細胞を融合し、(4) 融合した細胞を未融合のミエローマ細胞を支持しない媒質中で希釈して培養して、抗体産生細胞とミエローマ細胞が融合したハイブリドーマを選別し、(5) ハイブリドーマを含有する各培養穴中の上清液について、免疫感作したMASPとの反応性を指標として、抗体の存在を確認し、(6) 所望の抗体を生成するハイブリドーマを選出した後、限界希釈法により、単一クローンにし、(7) この単一クローンのハイブリドーマの培養上清液からモノクローナル抗体を回収することを特徴とするヒトのMASPに対するモノクローナル抗体の製造方法。

【請求項4】 さらに、(8) 回収したモノクローナル抗体が活性型のMASPの93kdの分子量のタンパク質を識別するという特徴を備えていることを確認する請求項3記載の製造方法。

【請求項5】 ヒトのMASPに対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、モノクローナル抗体に関し、さらに詳しくは、ヒトのMASP (MBP会合セリンプロテアーゼ) に特異的に反応するモノクローナル抗体、その活性フラグメント、該モノクローナル抗体の製造方法、及び該モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマに関する。なお、本発明において、モノクローナル抗体の活性フラグメントとは、抗原抗体反応活性を有するフラグメントを指称し、具体的には、F(a b')₂、Fab'、Fab、Fv、及び組み替えFv体、一本鎖Fv(scFv) などである。

【0002】

【従来の技術】 血清中には、酵母マンナンに結合するMBP (マンノース結合タンパク質またはマンナン結合タンパクの略; mannose-binding protein) と呼ばれる動物レクチンが存在しており、現在までに、ヒト、ウシ、ウサギ、ラットから単離されている。いずれのMBPも、分子量30~40kDのサブユニット分子がジスルフィド結合した高分子量のポリマーである。MBPは、マンノースとN-アセチルグルコサミンに親和性があり、結合にカルシウムイオンを要求す

2

るいわゆるC型レクチンに属している。

【0003】 MBPのサブユニットは、構造上の特徴として、次の三つのドメインより構成されている。

①NH₂末側のシステインに富むドメイン、

②これに続くグリシンが2つ置きに繰り返し出現するコラーゲン様構造、及び

③COOH末側のC型レクチンに共通して存在する高い相同性を有するアミノ酸より構成されるCRD (carbohydrate recognition domain) と呼ばれる糖類認識部位。

【0004】 MBPは、このサブユニットの三分子がNH₂末側のシステイン残基間のジスルフィド結合を介してつながり、一つの構造単位となっている。さらに、構造単位どうしが、ジスルフィド結合により、分子サイズが多様なポリマーを形成しているが、ペンタマーとヘキサマーが主なポリマーである。

【0005】 血清MBPは、グラム陰性細菌のリポ多糖 (LPS) やウイルスの表面にあるマンノースやN-アセチルグルコサミンに結合後、次に挙げるように、生体防御因子として機能することが次第に明らかになってきた。

(1) MBPは、salmonella montevideoに結合して、食細胞機能を亢進させるオプソニンとなる。これは、MBPの分子構造がC1qに類似していることに基づく。C1qは、食細胞上のC1qレセプターを介してオプソニン活性を発揮するが、MBPもC1qレセプターに結合できてC1qと同様な活性を示す。

(2) MBPは、HIV (ヒト免疫不全ウイルス) の高マンノース型糖タンパク質のgp120への結合により、HIVの細胞への感染を抑制する。

(3) MBPには、補体活性化古典的経路及び補体活性化第二経路による活性化能があり、ある種のグラム陰性菌に結合後、血清存在下で殺菌的に働く。細菌表面上でのMBPによる補体活性化反応は、オプソニンであるC3bやiC3bの産生につながり、食細胞の貪食能を高める結果となる。近年、酵母マンナンへのオプソニン化不全血清が発見され、その中のMBP量が異常な低値であることが明らかとなり、このような血清を持つ小児において、細菌の繰り返し感染などの症状を呈する例が報告されている。

【0006】 MBPによる補体活性化古典的経路の活性化のメカニズムの研究は、川崎及びReidの二つのグループにより行われ、1990年にそれぞれ発表された。両グループとも、マンナン上のヒトMBPに補体第一成分の亜成分の未活性型C1r₂C1s₂ (ヘテロ四量体) が結合後、C1sが活性型へ変換することを再構成実験で示した。この結果から、補体活性化古典的経路において、MBPは、C1qと同様に、血清中のC1rとC1sをプロテアーゼ成分として利用すると推定され

た。これに対して、最近、本発明者らは、MBPによる補体活性化反応には、C1rやC1sとは別の、MBPと結合性を有する新たなセリンプロテアーゼが関与していることを明らかにした。以下に、その研究について概要を紹介する。

【0007】(MASPの単離) 従来より、血清MBPの精製は、固定化マンナンカラムを用いてアフィニティークロマトグラフィーにより行われてきた。MBPによる補体活性化古典的経路における活性化のメカニズムに関する川寄やReidらの実験結果に基づけば、この精製方法では、血清がマンナンカラムを通過すると、MBPによる補体活性化が起こり、MBPには、活性型C1r₂C1s₂がカルシウムイオンを介して結合している可能性があった。しかし、従来の精製方法では、たとえMBP-C1r₂-C1s₂複合体がマンナン上で形成されたとしても、MBPのマンナンカラムからの溶出にEDTAが用いられていたために、精製の過程でMBPとC1r、C1sが解離して、結果的にMBPのみ単離されていたと思われた。このことは、MBPにC1r、C1s以外の同様な活性を持つプロテアーゼがカルシウムイオンを介して結合していたとしても、精製過程でそれらが失われていた可能性も含まれることを意味していた。そこで筆者らは、MBPを複合体のまま精製する目的で、マンナンカラムからのMBPの溶出に、カルシウムイオン存在下マンノースを用いる方法を適用した。この溶出画分より出発して、最終的には抗MBPセファロースカラムを用いることにより純度の高いMBPを精製した。次に、このようにして得られたMBP画分のC1s活性の有無を、古典的経路での活性化能を指標として検討した。マンナン結合ヒツジ赤血球(Emanan)に、MBP画分を吸着後、C4とC2を反応させる。ここで、MBP画分中にC4とC2を活性化するC1s活性を持つプロテアーゼが含まれているならば、Emanan上で古典的経路のC3コンベルターゼ(C4b2a)が形成され、そこにC3からC9までの補体成分が加われば、Emananの溶血が起こることになる。

【0008】本方法でアツセイすると、MBP画分にはC4とC2を活性化するプロテアーゼ成分が含まれていること、さらに、このC1s様プロテアーゼ活性は、p-APMSFで阻害されることから、セリンプロテアーゼが活性の本体であることが判明した。また、MBP画分には、C1sと同様なC4消費活性が認められた。そこで、次に、MBP画分中のC1s様セリンプロテアーゼの単離を試みた。EDTA存在下、MBP画分を抗MBPセファロースカラムに通すことにより、C4消費活性を有するC1s様セリンプロテアーゼは、非吸着画分に回収されてMBPと分離した。このC1s様セリンプロテアーゼは、非還元下分子量約83kDで、66kD(H鎖)と31kD(L鎖)の二本鎖構造の単一成分であった。そこで、この成分をMBP-associat

ed serine protease (MBP会合セリンプロテアーゼ、MASP)と命名した。

【0009】(MASPとC1sの比較) MASPは、MBPと複合体を形成しているC1s活性を持つセリンプロテアーゼであり、従来の仮説によれば、C1sが最有力候補として考えられた。そこで、MASPとC1sの性状を比較検討した。両者に分子サイズの明らかな違いが見られる。C1sのL鎖にはセリンプロテアーゼの活性セリン残基があり、これに結合するトリチウム標識Diisopropyl fluorophosphate (³H-DFP)はL鎖に取り込まれるが、MASPも同様にL鎖がラベルされることがわかった。ポリクローナル抗C1s抗体は、C1sによるC4消費活性を完全に阻害するが、MASPによる消費活性には全く影響を与えなかった。なお、C1sによるC4消費活性は、C4のC1aとC4bへの限定分解を意味しているが、MASPによってもC4の限定分解が確認された。C1sは、C4のほかにC2の消費活性もあるプロテアーゼであるが、MASPも同様にC2消費活性を持っている。MASPのL鎖のNH₂末側部分アミノ酸配列を決定したところ、部分的にC1sとアミノ酸の一致が見られたが、両成分は異なるプロテアーゼであった。以上の結果より、MASPとC1sとは、機能的にも構造的にも極めて類似しているが、異なる成分であることが明らかとなった。

【0010】(MASPの活性化) EDTA存在下、抗MBPセファロースカラムを用いてMBPとMASPを分離する以前のMBP画分には、マンナンへの結合によるC4とC2を活性化して古典的経路のC3コンベルターゼを形成させる能力がある。しかし、両成分が分離すると、それぞれ単独では本活性は失われる。そこで、MBPとMASPによる再構成により、活性の回復の有無を検討した。その結果、EmananにMBPとMASPを同時に反応させることにより、マンナン上でのC3コンベルターゼ形成能が再現された。この結果は、MBPとMASPが再会合したことを示している。

【0011】C1sとの類似性より、これまで述べてきた二本鎖構造のMASPは、C1sの活性型に相当すると推定された。このため、MBP-MASPによる補体活性化においても、MASPに未活性型の一本鎖proenzymeが存在して、MBPがリガンドに結合することにより、これが活性型MASPに変換することが予想された。そこで、筆者らは、ヒト血清中から活性化の抑制が期待できる条件下MASPを精製したところ、分子量約93kDの一本鎖のproenzymeを得た。このproenzymeMASPは未活性型であり、C4消費活性を持たないが、マンナン結合のMBPと反応して活性型へ変換した。

【0012】(MBP-MASPとRa-reactive factor) 脊椎動物の血清中には、Salm

oneilla菌のRaタイプや大腸菌のR2タイプのLPSに含まれるグリセロマンノヘプトースやN-アセチルグルコサミンに結合後補体活性化を起こして殺菌作用を示すレクチンのRa-reactive factor (RaRF) が存在している。川上らにより *Salmonella cyphimurium* に結合するマウスRaRFについて詳細に研究されてきた。その結果、マウスRaRFとMBPとの類似性が明らかとなってきた。マウスRaRFの構成成分は、少なくともLPSの糖鎖を認識する成分とC4/C2を活性化するセリンプロテアーゼ成分からなり、前者は、MBPと、一方後者は、MASPと類似している。最近、ヒトMBPは、ヒトRaRFの糖鎖認識成分であることが明らかとなった。これらの事実より、MBP-MASP複合体とRaRFとは同一成分と考えられる。

【0013】

【発明が解決しようとする課題】MBP-MASPによる補体活性化経路は、マンノースやN-アセチルグルコサミンを有する侵入異物を標的にして排除するシステムであり、特に感染初期や免疫系が未発達な幼児期において重要な役割を担っていると考えられる。補体活性化経路は、これまでに、抗体を介さない第二経路と抗体が引き金となる古典的経路とが知られていた。MBP-MASPの経路は、C1に始まる古典的経路とは独立した新たな抗体を介さない活性化経路と言える。しかし、両経路は、C1またはMBP-MASPが活性化物質に結合後、未活性型セリンプロテアーゼが活性化されてC4とC2の分解活性を獲得する点で極めて類似の性質を持っている。ただし、C1は、抗原抗体複合体に結合後、まずセリンプロテアーゼC1rが活性化されて、次に活性型C1rがC1sを活性化するのに対して、MBP画分中にはMASP以外のセリンプロテアーゼ活性を持つ成分の存在は確認されておらず、MASPは、C1r活性も兼ね備えたセリンプロテアーゼであると推定される。補体系の進化上、MBPは、C1qよりも先に出現したと考えられることから、C1に相当するMBP-MASP複合体による活性化経路の解析は、今後古典的経路の起源を理解する上で重要な情報を提供するものと期待される。しかし、MASPが生理的にどう作用するかについては、その特異抗体がないことから十分なされていないのが現状である。

【0014】本発明の目的は、ヒトのMASPに特異的に反応するモノクローナル抗体、その活性フラグメント、該モノクローナル抗体の製造方法、及び該モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを提供することにある。本発明者らは、MASP、特に活性型MASPに反応する抗体を作製すれば、容易にMASPの生理的機能をはじめ多くのことが解析できるのではと考え、抗体の作製を試みた。そして、活性型MASPを免疫することにより、93kdのMASPと反応するモノクローナ

ル抗体を産生するハイブリドーマを樹立することに成功し、本発明を完成するに至った。

【0015】

【課題を解決するための手段】かくして、本発明によれば、ヒトのMASP (MBP会合セリンプロテアーゼ) に対するモノクローナル抗体またはその活性フラグメントが提供される。また、本発明によれば、(1) 齧歯類動物をヒトのMASPで免疫感作し、(2) 免疫した齧歯類動物から脾臓を摘出して、脾細胞の懸濁液を形成し、(3) 該脾細胞懸濁液をマウスのミエローマ細胞と融合促進剤の存在下で混合して、両細胞を融合し、(4) 融合した細胞を未融合のミエローマ細胞を支持しない媒質中で希釈して培養して、抗体産生細胞とミエローマ細胞が融合したハイブリドーマを選別し、(5) ハイブリドーマを含有する各培養穴中の上清液について、免疫感作したMASPとの反応性を指標として、抗体の存在を確認し、(6) 所望の抗体を生成するハイブリドーマを選別した後、限界希釈法により、単一クローンにし、(7) この単一クローンのハイブリドーマの培養上清液からモノクローナル抗体を回収することを特徴とするヒトのMASPに対するモノクローナル抗体の製造方法が提供される。さらに、本発明によれば、ヒトのMASPに対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマが提供される。

【0016】以下、本発明について詳述する。本発明のモノクローナル抗体は、ヒトのMASPに特異的に反応するモノクローナル抗体である。より具体的には、MASPの分子量93kdのタンパク質と反応するモノクローナル抗体である。このモノクローナル抗体の活性フラグメントとは、抗原抗体反応活性を有するフラグメントを指称し、具体的には、 $F(ab')_2$ 、 Fab' 、 Fab 、 Fv 、及び組み替え Fv 体、一本鎖 $Fv(scFv)$ などが挙げられる。

【0017】本発明に係るヒトのMASPに対するモノクローナル抗体、及び該モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、以下の工程を含む方法により製造することができる。

(1) 前記した方法により、ヒト血清から未活性型MASPを回収し、活性型に変換する。このヒトMASPを抗原として齧歯類動物(例、マウス)を免疫感作する。免疫感作は、通常、マウスの皮下に行う。

(2) 免疫した齧歯類動物から脾臓を摘出して、脾細胞の懸濁液を形成する。

(3) 該脾細胞懸濁液を、あらかじめ培養しておいたマウスのミエローマ細胞と融合促進剤(例、ポリエチレングリコール)の存在下で混合して、両細胞を融合させる。ここで用いるミエローマ細胞としては、次の選択培養において、抗体産生細胞と識別可能なもの(例、8-アザグアニン耐性株)を用いる。

(4) 融合した細胞を未融合のミエローマ細胞を支持し

7

ない媒質中で希釈して培養して、抗体産生細胞とミエローマ細胞が融合したハイブリドーマを選別する。すなわち、抗体産生細胞は生存できるが、ミエローマ細胞は死滅する選択培地（例、ヒポキサンチン-アミノプテリン-チミジン培地；HAT培地）中で培養することにより、ハイブリドーマを選別する。

【0018】(5) ハイブリドーマを含有する各培養穴中の上清液について、前記免疫感作に用いたMASPとの反応性を指標として、抗体の存在を確認する（例、ELISA法）。これにより、選択培地中で増殖した細胞の培養上清中に分泌されている抗体が、所望の抗原に対するものか否かを決定する。

(6) 所望の抗体を生成するハイブリドーマを選択した後、限界希釈法によりクローニングして、単クローンにする。

(7) この単クローンのハイブリドーマの培養上清液からモノクローナル抗体を回収する。

(8) 回収したモノクローナル抗体が活性型のMASPの93kdの分子量のタンパク質を識別するという特徴を備えていることを確認する。

【0019】

【実施例】以下、実施例を挙げて、本発明についてより具体的に説明する。

【0020】【実施例1】

(1) MASPの精製

ヒト血清100mlからMASPの精製を行った。精製法は、血清100mlに対し、マンナン-セファロース（ファルマシア社製）10mlを用いて、吸着部分を回収した（25ml）。この画分をさらに抗MBP-セファロース（ファルマシア社製）5mlを用いてアフィニティー精製した。最終的に未活性型MASP5mgを回収した。

【0021】(2) 免疫感作

精製した未活性型MASPをEDTA処理により活性型MASPに変換した。この活性型MASP100μgをフロイント完全アジュバンド100μgと混合し、Balb/cマウスの皮下に免疫感作した。1週間後、活性型MASP100μgをフロイント不完全アジュバンド100μgと混合し、同マウスの皮下に追加免疫感作した。この操作を1週間に1回合計4回繰り返し、免疫感作を実施した。

【0022】(3) 融合

上記で免疫感作したマウスから脾臓を取り出した。取り出した脾臓を細断後、メッシュで濾過し、RPMI1640培地に浮遊させ、脾細胞 1×10^8 個を得た。この脾細胞を、マウス由来の8-アザグアニン耐性株（ヒポキサンチン・グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ欠損株）P3U1（ 2×10^7 個）と、約5:1の割合で混合し、遠心した（1500rpm、5分）。得られた細胞のペレットに、融合促進剤として50%ポリエチ

8

レングリコール4000（メルク社製）/RPMI1640溶液2mlを37℃の温水中で攪拌しながら6分間を要して加え、細胞融合を行った。融合後、大量（約40ml）のRPMI1640液を加え、遠心分離して上清を除去した。次いで、ヒポキサンチン（100μM）、アミノプテリン（0.4μM）、チミジン（10μM）を含む10%FBS-RPMI1640培地（HAT）培地にて、脾細胞が 1×10^6 個/mlになるように調製した。

【0023】(4) ハイブリドーマの選択

上記で調製した細胞浮遊液を96ウェル（培養穴）、マイクロプレート5枚に200μlずつ分注し、37℃5%CO₂下にあるCO₂インキュベータで細胞を培養した。2週間後には、ハイブリドーマのみがコロニーを形成し、増殖していることが確認できた。

【0024】(5) 抗体の検出

ハイブリドーマが十分増殖していることが確認されたので、その培養上清を用い、MASPとの反応性をELISA法にて検出することにより、抗体の検出を行った。96ウェルマイクロプレート（イムロン2）に、MASP10μg/mlで、100μlずつコーティングした（4℃、一晚）。その後、MASPを吸引除去した後、1%BSA・PBSを200μl加え、ブロッキングを行った（室温、2h）。その後、PBSで洗浄を行い、ハイブリドーマの培養上清200μlずつ加え反応させた。1時間の反応後、PBSで洗浄を行い、2次抗体（ペルオキシダーゼ標識抗マウスIg）を加え、さらに1時間後反応した。その後、PBSで洗浄し、オルト・フェニレンジアミン、過酸化水素水を基質として発色反応を行った。その後、イムノリーダーで発色しているウェルの吸光度を測定した。その結果、発色しているウェルの細胞を選別した。

【0025】(6) クローニング

抗体産生細胞を、限界希釈法により1コ/ウェルとなるように、96ウェル・マイクロプレートに分注し、培養した。10日間の培養後、シングルコロニーの増殖が確認できたため、再び(5)の抗体検出の操作を施した。その結果、活性型MASPに対するクローンが得られた。得られたクローンは、IgG₁型のモノクローナル抗体であり、これをMASP-1と命名した。

【0026】(7) ウエスタンブロット

得られたモノクローナル抗体MASP-1を用いて、MBP会合性セリンプロテアーゼとの反応性を調べた。その結果、93kdの分子と反応することが判明した。

【0027】

【発明の効果】本発明のヒトのMASPに対するモノクローナル抗体は、以下に述べるような種々の用途が考えられる。本発明のモノクローナル抗体を用いることにより、生体内におけるMASPの生理的役割がわかるとともに、補体活性化経路の新たな経路の解明に役立つ。さ

らに、この新たな補体活性化経路が、感染初期あるいは免疫系が未発達な幼児期における役割が解明でき、幼児の治療への有用な手がかりを与えることになる。したがって、本発明のモノクローナル抗体は、生体内におけ

るMASPの生理的役割等を解明するための薬剤等として、免疫系分野における研究と関連産業分野において有用である。

フロントページの続き

(51)Int. Cl.⁶

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

// C 1 2 N 15/02

(C 1 2 P 21/08

C 1 2 R 1:91)